



TITLE:

悪性黒色腫細胞B16F10における、
emodinの細胞内ATPレベルと増殖
に対する効果と作用機序の解明(
Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

杉山, 悠真

CITATION:

杉山, 悠真. 悪性黒色腫細胞B16F10における、emodinの細胞内ATPレベルと増殖に対する効果と作用機序の解明. 京都大学, 2019, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2019-09-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22100>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	杉山 悠真
論文題目	悪性黒色腫細胞 B16F10 における、emodin の細胞内 ATP レベルと増殖に対する効果と作用機序の解明		
(論文内容の要旨)			
<p>がんの化学療法において古くから標的とされてきたのは、異常な細胞増殖を支える活発な DNA 合成や微小管機能であるが、これらを標的とした場合、副作用を抑えつつ十分な抗腫瘍効果が得られるケースは少ない。近年は分子標的薬の登場により、がん治療の個別医療化が進んでいる。しかし、このような個々のがんに特化した治療戦略ですべてのがんをカバーするのは現実的でなく、様々なタイプのがんに共通する、新しい治療戦略を模索する努力を怠るべきではない。</p> <p>発生部位やステージに関わらない、がんに共通する性質は無秩序な細胞増殖である。この性質を維持するためにがん細胞は多大なエネルギーを消費していると考えられ、実際に多くのがん細胞では解糖系が強く活性化している。この活性化は Warburg 効果と呼ばれ、大きなエネルギー需要に対応している可能性が高い。申請者は、がん細胞が持つ大きなエネルギー需要、あるいはその需要を満たす特有のエネルギー代謝を標的とした新規治療戦略の構築を目指した。</p> <p>悪性黒色腫は難治性の皮膚がんであり、治療効果も十分ではない。マウス悪性黒色腫細胞 B16F10 を正常組織由来の MEF(mouse embryonic fibroblast)細胞と比較した結果、増殖、解糖系、ミトコンドリアの呼吸が非常に活発であった。約 1000 種類の植物抽出物のスクリーニングによりイタドリの根の抽出物が、B16F10 細胞の細胞内 ATP レベルを顕著に低下させるが、MEF 細胞に対してはその作用が明らかに弱いことが見つかった。精製の結果、有効成分として emodin を同定した。</p> <p>emodin は精製前の抽出物と同様に、B16F10 細胞の ATP レベルを顕著に低下させ、その増殖を <i>in vitro</i>、<i>in vivo</i> の両方の評価系において有意に抑制した。また、emodin はミトコンドリアの膜電位を速やかに低下させ、一方、酸素消費速度を上昇させた。これら 2 つの細胞現象が同時に起こることから、emodin はミトコンドリアの脱共役作用を持つことが想定された。実際、既存の 3 つのミトコンドリアの脱共役剤が両細胞株の ATP レベルと増殖に対し、emodin とよく似た作用を及ぼした。以上のことから、emodin はミトコンドリアの脱共役剤として作用していると結論した。</p> <p>emodin によるミトコンドリア膜電位の低下と呼吸の上昇は両細胞株において同程度に観測されたが、代償的な解糖系の亢進は MEF 細胞の方が明らかに顕著だった。このような解糖系の亢進はミトコンドリアの機能障害を補うための細胞応答として知られ、“予備解糖能”と呼ばれる。MEF 細胞はこの予備解糖能により emodin 存在下でも ATP レベルを保てるが、B16F10 細胞は予備解糖能が乏しく、ATP レベルを維持出来ないと考えられた。これを支持する結果として、グルコースが存在しない条件下で MEF 細胞に emodin を処理すると、ATP レベルの低下と細胞増殖の抑制が観察された。</p> <p>以上の結果は、顕著な Warburg 効果を示すがん細胞で予備解糖能が低下しているケースでは、ミトコンドリア脱共役という治療戦略が有効である可能性を示している。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

がんの治療は遺伝子診断と分子標的薬に主軸を置いた個別医療化が進んでいるが、適用できるケースは限られており、より広域なタイプのがんに効果的な治療法の模索も必要である。悪性黒色腫は予後が悪く、治療効果も不十分ながんのひとつである。本研究は、「広くがんに共通する悪性形質である無秩序な細胞増殖が、多大なエネルギー需要とそれに対する供給システムを必要としている」という考えに基づき、マウス悪性黒色腫細胞 B16F10 の細胞内 ATP レベルを標的とした異常増殖のコントロールを目的として行われた。

申請者は、B16F10 細胞の増殖とエネルギー代謝をマウスの正常組織由来の MEF 細胞と比較し、その両方が B16F10 細胞において非常に活発であることを確認した。次に、植物抽出液ライブラリーに対し、細胞内 ATP レベルに及ぼす影響を指標にスクリーニングを行い、イタドリの根の抽出物が、MEF 細胞に比して B16F10 細胞に対し有意な ATP 低下作用があることを見だし、精製により、この作用の有効成分は emodin であることを解明した。emodin は精製前の抽出物と同様に、MEF 細胞に比して B16F10 細胞の ATP レベルを顕著に低下させ、B16F10 細胞の増殖を *in vitro*、*in vivo* の評価系において有意に抑制することを示した。また、emodin がミトコンドリアの膜電位を速やかに低下させ、一方で酸素消費速度を上昇させたことから、申請者は、この化合物がミトコンドリアの脱共役作用を持つことを想定した。次に申請者は、既存の各種ミトコンドリア脱共役剤が、emodin と同様に MEF 細胞よりも B16F10 細胞に対して強い増殖抑制と ATP レベル低下作用を持つことを確認し、emodin はミトコンドリアの脱共役剤として作用していると結論した。emodin のミトコンドリアに対する作用は両細胞株において同程度に観測されたが、代償的な解糖系の亢進が、MEF 細胞の方が明らかに顕著であることを示した。このような解糖系の亢進はミトコンドリアの機能障害を補うための細胞応答として知られ、“予備解糖能”と呼ばれる。申請者は、MEF 細胞はこの予備解糖能により emodin 存在下でも ATP レベルを保てるが、B16F10 細胞は予備解糖能が乏しく、ATP レベルを維持出来ないと考えた。これを支持する結果として、グルコースが存在しない条件下で emodin を処理された MEF 細胞は増殖と ATP レベルを維持できないことを確認した。

以上、本論文は、天然成分として単離された emodin がミトコンドリアの脱共役剤として作用することでマウス悪性黒色腫細胞 B16F10 に対して細胞内 ATP レベルと増殖を低下させること、またこれらの作用は Warburg 効果が強く予備解糖能が乏しい B16F10 細胞に対し強く誘導されることを示したもので、生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見と概念を提示している。よって、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。さらに、2019 年 8 月 9 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行なった結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第 8 条の規定により、猶予期間は学位授与日から 3 ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日